



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1554号
学位記番号	第1109号
氏名	Mohammed Hassan Gaballah
授与年月日	平成29年3月24日
学位論文の題名	<p>Simultaneous time course analysis of multiple markers based on DNA microarray in incised wound in skeletal muscle for wound aging (骨格筋切創の受傷後経過時間推定のためのDNAマイクロアレイに基づく各種マーカーの経時的動態の同時解析)</p> <p>Forensic Science International 2016; 266: 357-368</p>
論文審査担当者	<p>主査： 大塚 隆信 副査： 高橋 智, 青木 康博</p>

## 論文内容の要旨

損傷の受傷時期の推定は法医実務上の重要鑑定事項であり、病理組織学的あるいは免疫組織化学的検討を始めとして多くの報告がなされ、近年は分子病理学的手法による分析も行われている。これらは主として皮膚損傷を対象として研究が進められているが、致死的な刺創、切創では皮膚と共に骨格筋を損傷することが多く、骨格筋の鋭器損傷に関する検討も重要である。

本研究では、マウス骨格筋切創モデルを作成し、DNA マイクロアレイにより各種サイトカイン等について遺伝子発現解析を行い、顕著な変動を見せた遺伝子につき経時的に動態を探索するとともに、受傷後経過時間推定への可能性について検討した。

**材料および方法.** 8 週齢の雄性 BALB/C マウスの大腿二頭筋に全長 5mm の切創を作成し、皮膚を縫合し、6, 12, 24, 36, 48 時間後に損傷部の筋 30mg を周囲非損傷部とともに摘出した。対照として非損傷筋を同様に摘出した。摘出組織は RNA 安定化剤に浸漬後ビーズ破砕機にて粉碎し、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。DNA マイクロアレイ解析は Oncomics 社 (名古屋) に依頼し、受傷後 12 時間群および対照群 (各群  $n = 4$ ) につき、Supreprint Mouse GE 8x60k <G4852A> Microarray Kit (Agilent Technologies) を用いてハイブリダイゼーションを行った後、DNA Microarray Scanner (Agilent G2539A) によりスキャンした。両群間で顕著な差異 (変動) を示す遺伝子を対応のない Student *t*-test により検出するとともに、遺伝子オントロジー解析およびパスウェイ解析を行った。

一方、マイクロアレイ解析の結果を踏まえ、発現が顕著に増加した遺伝子群の中から、chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5), chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), interleukin 1beta (IL-1b), interleukin 6 (IL-6) の 4 遺伝子、およびパスウェイ解析の結果をもとに interleukin 7 (IL-7) を選択し、経時的変動を定量的逆転写 PCR 法 (qRT-PCR) により検討した。試料 (各群  $n = 10$ ) よりキットを用いて RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) を用い cDNA を合成し、TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) を用い、 $\Delta \Delta C_t$  法で相対定量を行い、Wilcoxon 符号順位検定にて、各時点での遺伝子発現の差につき検定した。さらに組織をパラフィン包埋・薄切し、各サイトカインに対する抗体を用いて、その発現について定性的検討を行った。

**結果.** マイクロアレイ・プレート上の 55,681 遺伝子のうち、27,207 遺伝子につき検討を行い、2 倍以上の変動を見せた 7,238 遺伝子を同定した。この内、受傷後 12 時間群において発現上昇が見られたものは 3,655 遺伝子であり、もっとも変動が大きかったものは CXCL5 (2260 倍) であり、Gm5483 (1841 倍) および CCL4 (1409 倍) がこれに続いた。遺伝子セット解析により発現上昇遺伝子が関与する 51 のパスウェイが検出され、主としてクエン酸回路、糖新生、プリン代謝、グリコーゲン代謝などに関連する経路を含んでいた。遺伝子オントロジー解析では発現上昇遺伝子に関連し 971 プロセスが検出された。

qRT-PCR にて発現動態を検討した 5 遺伝子のうち、IL-7 を除く 4 遺伝子は受傷後早期 (6 時間後) より顕著な発現上昇が認められた。CXCL5 は全期間を通じ最も発現上昇率が高かったが、受傷後 48 時間後には有意な低下を認めた。IL-1b も同様の変動を示した。IL-6 は受傷後 12 時間後には有意に低下し、48 時間後にはさらに低下した。CCL4 は 36 時間後まで持続的に上昇した。これらに対し IL-7 は受傷後緩徐に上昇し、48 時間後に発現が最大となった。免疫組織化学的にはいずれのマーカーも受傷後創部周囲において経時的なシグナルの増強を認めた。

**考察.** DNA マイクロアレイ解析の結果、骨格筋の鋭的損傷およびその後の治癒過程において多く

の遺伝子がさまざまなオンコロジー・タームやパスウェイに関与することが示された。今回経時的動態を解析したサイトカインのうち、IL-6 は早期の発現上昇とそれに引き続く低下がみられ、myoblast の増殖開始への関与を反映しているものと考えられた。また、CXCL5 は増殖する myoblast から分泌されることが知られており、その mRNA は受傷後早期から持続的に強い発現が見られた。IL-1b も同様に早期より上昇し、持続的に損傷修復に関与していると考えられた。一方 CCL4 は炎症細胞より分泌され、発現上昇が遷延する傾向が認められた。IL-7 は分化した筋細胞から分泌されるとされ、筋再生に関与し、緩徐な発現上昇パターンを示したものと考えられた。本研究で得られた経時的動態に関する知見は骨格筋損傷修復過程における各サイトカインの作用点を反映しており、受傷時期あるいは受傷後経過時間推定に利用可能なツールであると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 審査論文の要旨

【目的】損傷の受傷時期の推定は法医実務上の重要鑑定事項であり、近年は分子病理学的手法による分析が、主として皮膚損傷を対象として研究が行われている。本研究では、マウス骨格筋切創モデルを作成し、DNA マイクロアレイにより各種サイトカイン等について遺伝子発現解析を行い、顕著な変動を見せた遺伝子につき経時的に動態を探索した。

【方法】8週齢の雄性 BALB/C マウスの大腿二頭筋にイソフルレン麻酔下で全長 5mm の切創を作成し、皮膚を縫合し、6, 12, 24, 36, 48 時間後に損傷部の筋を摘出した。摘出組織より RNA を抽出し、受傷後 12 時間群および対照群（各群 n = 4）につき、DNA マイクロアレイ解析を行った。両群間で顕著な差異（変動）を示す遺伝子に対応のない Student t-test により検出するとともに、遺伝子オントロジー解析およびパスウェイ解析を行った。一方、マイクロアレイ解析の結果を踏まえ、発現が顕著に増加した遺伝子群の中から、chemokine (C- X- C motif) ligand 5(CXCL5), chemokine (C- C motif) ligand 4 (CCL4), interleukin 1beta(IL-1b), interleukin 6 (IL-6) の 4 遺伝子、およびパスウェイ解析の結果をもとに interleukin 7 (IL-7) を選択し、経時的変動を定量的逆転写 PCR 法 (qRT-PCR) により各時点での遺伝子発現の差について、Wilcoxon 符号順位検定を用い検討した。さらに組織をパラフィン包埋・薄切し、各サイトカインに対する抗体を用いて、その発現について定性的な免疫組織学的検討を行った。

【結果】マイクロアレイ解析では 2 倍以上の変動を見せた 7,238 遺伝子を同定し、この内、受傷後 12 時間群において発現上昇が見られたものは 3,655 遺伝子であり、CXCL5 (2260 倍) が最も大きく変動し、Gm5483 および CCL4 がこれに続いた。遺伝子セット解析により発現上昇遺伝子が関与する 51 のパスウェイが検出され、遺伝子オントロジー解析では発現上昇遺伝子に関連し 971 プロセスが検出された。qRT-PCR にて発現動態を検討した 5 遺伝子のうち、IL-7 を除く 4 遺伝子は受傷後早期（6 時間後）より顕著な発現上昇が認められた。CXCL5 は全期間を通じ最も発現上昇率が高かったが、受傷後 48 時間後には有意な低下を認めた。IL-1b も同様の変動を示した。IL-6 は受傷後 12 時間後には有意に低下し、48 時間後にはさらに低下した。CCL4 は 36 時間後まで持続的に上昇した。これらに対し IL-7 は受傷後緩徐に上昇し、48 時間後に発現が最大となった。免疫組織化学的にはいずれのマーカーも受傷後創部周囲において経時的なシグナルの増強を認めた。

【考察】DNA マイクロアレイ解析の結果、骨格筋の鋭的損傷およびその後の治癒過程において多くの遺伝子がさまざまなオントロジー・タームやパスウェイに関与することが示された。今回経時的動態を解析したサイトカインのうち、IL-6 は早期の発現上昇とそれに引き続く低下がみられ、高い発現を見た CXCL5 とともに受傷後早期のマーカーとして有用と考えられた。一方 CCL4 は発現上昇が遷延する傾向が認められ、後期（受傷後 24 時間以降）のマーカーたりうると考えられた。IL-7 は筋再生に関与し、緩徐な発現上昇パターンを示したものと推定された。

### 2. 審査内容の要旨

プレゼンテーション終了後、主査の大塚から、鋭器損傷である切創作成の際にメスでなくハサミを用いた理由などの実験手技・方法に関する事柄、また結果をヒトに外挿できるか、あるいは臨床応用を含めヒトに応用する際の留意点は何か、さらに DNA 解析の結果の解釈等について 21 項目の質問がなされた。第 1 副査の高橋教授からは、対照試料の設定・選択、免疫染色における抗体の最適化の方法、および組織所見の診断・解釈等に関する 6 項目の質問・指摘がなされた。第 2 副査の青木教授からは専門領域に関連して、鋭器損傷と鈍器損傷の鑑別、肉眼所見による受傷後経過時間の推定法、ブラック・アイの成因等 5 項目の質問がなされた。これらの質問・指摘に対し、おおむね満足できる回答が得られ、申請者は学位論文の主旨を十分理解しているとともに、法病理学に関する知識を有していると判断された。骨格筋の鋭器損傷受傷後のサイトカイン動態を探索した報告は少なく、本研究は骨格筋損傷修復過程の解明、受傷後経過時間推定にとって有用であると考えられた。以上より本論文の著者は博士（医学）の称号を与えるにふさわしいと判断した。

論文審査担当者 主査 大塚隆信

副査 高橋 智 青木康博